

博士課程用 (甲)

学 位 論 文 の 内 容 の 要 旨

須佐 岳人 印

Effects of repeated administration of pilocarpine and isoproterenol on aquaporin-5 expression in rat salivary glands.

(ピロカルピン、イソプロテレノールの反復投与によるラット唾液腺におけるAQP5への影響)

【序論】

口腔乾燥症は唾液腺が照射領域に含まれる頭頸部がんへの放射線照射、シェーグレン症候群、加齢などによる唾液分泌の低下が原因である。治療には唾液腺刺激薬であるピロカルピンを用い、症状の緩和に有効であることが多い。ピロカルピンはムスカリン受容体を刺激し、腺房細胞腺腔面のCl⁻チャネルを活性化する。この結果Cl⁻が腺腔へ放出され、Na⁺や水も腺腔面へ輸送される。唾液腺腺房細胞の腺腔面細胞膜には水チャネルであるアクアポリン5 (AQP5) が分布し、唾液の主成分である水の分泌に重要な役割を果たすと考えられているが、ピロカルピンによるAQP5の発現量の変化については明らかにされていない。本研究ではピロカルピンの反復投与によるAQP5の発現量の変化について検討をおこなった。また、アドレナリン受容体を刺激し、エキソサイトーシスによる唾液のタンパク質成分の放出を促進するイソプロテレノールの反復投与による影響についても検討してみた。

【方法】

実験は9週齢Wistar系雄ラットを次の3群に分けた。(1) ピロカルピンを1日2回(朝・晩)、7日間連続腹腔内投与(0.1 mg/100 g body weight)した群、(2) イソプロテレノールを1日2回(朝・晩)、7日間連続腹腔内投与(0.8 mg/100 g body weight)した群、(3) コントロール群として溶媒である生理食塩水を1日2回(朝・晩)、7日間連続腹腔内投与した群。各群のラットから耳下腺と顎下腺を採取し解析した。組織学的変化はパラフィン切片をH-E染色により、AQP5発現量と分布については凍結切片を用いた蛍光免疫染色およびウェスタンブロット法を用いて解析をおこなった。

【結果】

H-E染色の結果、ピロカルピン投与群では耳下腺・顎下腺ともに明らかな変化を認めず、イソプロテレノール投与群では耳下腺・顎下腺ともに腺房細胞の肥大が確認された。蛍光免疫染色でAQP5の染色を確認したところ、ピロカルピン投与群では耳下腺・顎下腺ともにAQP5のシグナルが低下していたが、イソプロテレノール投与群ではAQP5のシグナルが増加していた。また、いずれの条件下でもAQP5の分布には変化はなく、腺腔面の細胞膜に分布していた。ウェスタンブロット法で半定量的に解析したところ、ピロカルピン投与群では顎下腺でAQP5の有意な減少($P<0.05$)を認め、イソプロテレノール投与群では耳下腺・顎下腺ともにAQP5の有意な増加($P<0.01$)を認めた。イソプロテレノールはエキソサイトーシスを促進することから、次にエキソサイトーシスの頻度とAQP5の発現量との関係を調べた。エキソサイトーシスを抑制させる目的で3日間の絶食群を設定し、AQP5の発現を検討したところ、絶食によりAQP5が減少することが判明した。

【考察】

腺房細胞の腺腔面細胞膜での水の分泌にはたらくAQP5は、ピロカルピンの反復投与により発現が増加することが予想されたが、顎下腺においてAQP5の発現は有意に減少し、耳下腺でも同様の傾向が認められた。したがって、口腔乾燥症で用いるピロカルピンの効能にはAQP5の発現上昇は関係ないことが示唆された。腺房での水の輸送経路にはAQP5を介するtranscellular pathwayのほかに細胞間隙を通過するparacellular pathwayもあり、ピロカルピンによる水の分泌にはparacellular pathwayが優位であるのかもしれない。一方で、唾液のタンパク質成分の放出を促すイソプロテレノールの反復投与によって耳下腺・顎下腺ともにAQP5の発現が増加したが、絶食によってAQP5が減少することから、エキソサイトーシスが盛んにおこるとAQP5の発現が高まる可能性が示された。AQP5の発現は、cAMPの上昇によりPKA/cAMP responsive element binding protein (CREB) を介して高まるとの報告もあり、唾液腺においてもCREBを介してAQP5の発現が上昇した可能性も考えられる。

【結論】

本研究の結果から、口腔乾燥症の治療に有効なピロカルピンには、AQP5の発現を上昇させる作用はなく、ピロカルピンの効能はAQP5とは関係がないことが考えられた。一方で、唾液のタンパク質成分の放出を促すイソプロテレノールにはAQP5の発現を大きく上昇させる効果があることが判明した。これらの結果は唾液腺におけるAQP5の役割と水分泌の機構に関する理解を深めるうえで有用な知見である。